

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2001-149069

(43)Date of publication of application : 05.06.2001

(51)Int.Cl.

C12N 5/02

A61K 35/14

A61P 35/00

C12N 5/06

C12Q 1/04

(21)Application number : 11-336079

(71)Applicant : INST OF PHYSICAL & CHEMICAL  
RES

(22)Date of filing : 26.11.1999

(72)Inventor : ONO TADAO  
SAIJO KAORU

## (54) METHOD FOR PROLIFERATING NATURAL KILLER CELL

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method for efficiently proliferating a natural killer cell in a state of keeping a high cytotoxic activity.

SOLUTION: This method for proliferating a human natural killer cell comprises a process for mixed culture of peripheral mononuclear cell and human Wilms's tumor cell strain HFWT previously lost proliferation ability in the presence of interleukin 2. This method for assaying cytotoxic activity of human natural killer cell comprises a process for carrying out the mixed culture of human Wilms's tumor cell strain HFWT and a human natural killer cell and dyeing a target cell living after the culture by using crystal violet.

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 27.03.2001

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number] 3619853

[Date of registration] 26.11.2004

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19) 日本国特許庁 ( J P )

(12) 公開特許公報 ( A )

(11) 特許出願公開番号

特開2001-149069

( P 2 0 0 1 - 1 4 9 0 6 9 A )

(43) 公開日 平成13年6月5日 (2001.6.5)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テマコード (参考)
C12N 5/02		C12N 5/02	4B063
A61K 35/14		A61K 35/14	Z 4B065
A61P 35/00		A61P 35/00	4C087
C12N 5/06		C12Q 1/04	
C12Q 1/04		C12N 5/00	E
審査請求 未請求 請求項の数 9 O L (全 8 頁)			

(21) 出願番号	特願平11-336079	(71) 出願人	000006792 理化学研究所 埼玉県和光市広沢 2 番 1 号
(22) 出願日	平成11年11月26日 (1999.11.26)	(72) 発明者	大野 忠夫 茨城県つくば市高野台 3 丁目 1 番 1 理化学研究所ライフサイエンス筑波研究センター内
		(72) 発明者	西條 薫 茨城県つくば市高野台 3 丁目 1 番 1 理化学研究所ライフサイエンス筑波研究センター内
		(74) 代理人	100092635 弁理士 塩澤 寿夫 (外 2 名)
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 ナチュラルキラー細胞の増殖方法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 高い細胞傷害活性を保った状態のナチュラルキラー細胞を効率的に増殖する方法を提供する。

【解決手段】 末梢血単核球細胞とあらかじめ増殖能を失わせたヒトウィルス腫瘍細胞株HFWTとをインターロイキン-2の存在下で混合培養する工程を含む、ヒトナチュラルキラー細胞の増殖方法。及び、ヒトウィルス腫瘍細胞株HFWTとヒトナチュラルキラー細胞とを混合培養し、培養後に生存した標的細胞をクリスタルバイオレットを用いて染色する工程を含むヒトナチュラルキラー細胞の細胞傷害活性の測定方法。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 末梢血単核球細胞とヒトウイルス腫瘍細胞株HFWTとを混合培養する工程を含む、ヒトナチュラルキラー細胞の増殖方法。

【請求項2】 ヒト個体より分離した末梢血単核球細胞を用いて、該ヒト個体自身のナチュラルキラー細胞を増殖させる請求項1に記載の方法。

【請求項3】 ヒト個体が腫瘍患者である請求項2に記載の方法。

【請求項4】 あらかじめ増殖能を失わせたヒトウイルス腫瘍細胞株HFWTを用いる請求項1ないし3のいずれか1項に記載の方法。

【請求項5】 インターロイキン-2の存在下で培養を行う請求項1ないし4のいずれか1項に記載の方法。

【請求項6】 請求項1ないし5のいずれか1項に記載の方法によって製造されたヒトナチュラルキラー細胞。

【請求項7】 腫瘍患者より分離した末梢血単核球細胞を用いて請求項1に記載の方法により増殖させた該腫瘍患者自身のナチュラルキラー細胞を含む、該腫瘍患者のための腫瘍治療剤。

【請求項8】 ヒトナチュラルキラー細胞の細胞傷害活性の測定方法であって、ヒトウイルス腫瘍細胞株HFWTとヒトナチュラルキラー細胞とを混合培養し、培養後に生存した標的細胞を染色する工程を含む方法。

【請求項9】 染色にクリスタルバイオレットを用いる請求項8に記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、ヒトの免疫系細胞の製造方法に関するものである。

## 【0002】

【従来の技術】 動物体内にあるナチュラルキラー細胞（以下、本明細書において「NK細胞」と略す場合がある。）は、免疫反応の一翼を担うリンパ球系の細胞である。この細胞には様々な機能があるが、特に腫瘍細胞を殺す強い活性があることから、体内では腫瘍化した、あるいは腫瘍化しつつある異常な細胞を取り除く免疫監視機構の重要メンバーであると考えられている。従って、この細胞を腫瘍治療に有効利用しようという研究は古くから行われていた。

【0003】 例えば、リンホカインの一種であるインターロイキン-2（以下、本明細書においてインターロイキンを「IL」と略す場合がある）を大量に培養液に添加し、末梢血単核球細胞（以下、PBMC）を培養すると、ヒトの場合には1週間前後でいわゆるリンホカイン活性化キラーリンパ球（以下、本明細書において「LAK細胞」と略す場合がある）が増殖してくるが、この中にはNK細胞が多く含まれていることはよく知られている。LAK細胞は、Rosenbergらの研究（Rosenberg, S.A., et al., N. Engl. J. Med. 313, pp.1485-1492, 1985）以来、腫瘍

の養子免疫療法に広く使用されている。また、LAK細胞は感染症にも有効であることが知られており、抗生物質では治しにくい感染症対策として注目されている。しかしながら、LAK細胞を大量に増殖させるために2週間以上長期間培養すると、NK細胞の細胞傷害活性が大幅に下がる場合が多いので、LAK細胞培養によるNK細胞の取得は得策ではない。

【0004】 NK細胞の表面上にはNK活性阻害受容体（以下、本明細書において「NKIR」と呼ぶ場合がある）があり、これに結合する分子があるとNK細胞の細胞傷害活性は阻害される（Gumperz, J. E. and Parham, P., Nature, 378, pp.245-248, 1995）。一般に、正常細胞の表面には主要組織適合性抗原クラスI（以下、本明細書において「MHC-I」と呼ぶ場合がある）分子が発現されていて自己と非自己の識別に重要な役割をはたしているが、MHC-I分子群のなかにはNKIRに結合するものがあるため、通常、NK細胞の細胞傷害活性を測定するときはヒト慢性白血病細胞株K562を標的にして活性を測定する。これは、K562細胞がMHC-I分子をほとんど発現していないためである。しかも、K562細胞を殺すときには、NK細胞はさらに活性化され増殖することが知られている。

【0005】 最近、Stromingerのグループは、細胞表面にほとんどMHC-Iを発現していないヒトB細胞株721.221に放射線を照射して分裂能を失わせた状態とし、これをPBMCとともに5～6日間混合培養し、そこからNK細胞を精製してさらに培養を続けてNK細胞を大量に得る方法を開発した。この方法でメラノーマ患者から得られたNK細胞は、MHC-Iを発現していない患者自己メラノーマ細胞を殺せることが示されている（Porgador, A., et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 94, pp.13140-13145, 1997）。もっとも、この方法はNK細胞を増殖させるのには簡便であるものの、NK細胞の標的細胞として使用した721.221細胞株は、K562細胞と同様に実際上はわずかながらMHC-Iの発現があることから（Hay, R., American Type Culture Collection, personal communication）、K562細胞に比して特に効率よくNK細胞を増殖させるわけではない。

【0006】 一方、ヒトNK細胞の細胞傷害活性測定としては、K562細胞を標的細胞としてこれにあらかじめ放射性のCr-51を無機塩として取り込ませておき、K562細胞が死んだときに細胞外に遊離するCr-51の量を放射線測定器で測定する方法が標準的に使われている。この方法は、標的細胞に対して殺す側の細胞（すなわちエフェクター細胞）を大量に加えても、Cr-51が殺される側のK562細胞からのみ遊離するため、高感度で特異性が高い方法である。しかしながら、放射性物質を扱うため危険であるという逃れられない欠点がある。

【0007】 これに対して、本発明者らは、細胞傷害性Tリンパ球（以下、本明細書において「CTL」と呼ぶ場合がある）の活性測定法として、付着性細胞を標的細胞

として用いるクリスタルバイオレット染色法（以下、本明細書において「CV法」と呼ぶ場合がある）を提案している（Liu, S. Q., et al., Nature Medicine 1, pp. 267-271, 1995）。この方法は、標的細胞をエフェクター細胞と混合培養した後、細胞を相互に分離し、生き残った標的細胞をクリスタルバイオレットで染色して比色法で定量するため、放射性物質を必要とせず極めて安全である。

【0008】しかしながら、K562細胞が浮遊性細胞であるため、同じく浮遊性細胞であるエフェクター細胞と一旦混合した後では、標的細胞のみを分離することは非常に困難であり、ヒトNK細胞の活性測定にはCV法は適用できないという問題がある。K562細胞と同様にヒトNK細胞に高感受性で、しかも付着性の標的細胞が利用できればCV法が適用できるが、そのような報告はこれまでにない。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】本発明の課題は、従来から知られている方法よりも効率のよいNK細胞増殖法を提供することにある。より具体的には、従来の方法に比べて2倍以上の効率でPBMCからNK細胞を選択的に増殖させることができ、しかも高い細胞傷害活性を保った状態のNK細胞を得るための方法を提供することが本発明の課題である。また、上記の特徴を有する方法により生産されたヒトNK細胞、及び従来の方法よりも安全性の高いヒトNK細胞の細胞傷害活性測定法を提供することも本発明の課題である。

【0010】

【課題を解決するための手段】本発明者らは上記の課題を解決すべく鋭意努力した結果、NK細胞の標的細胞となる細胞群のなかで、MHC-I分子の発現誘導剤であるインターフェロンガンマ（以下、本明細書において「IFN $\gamma$ 」と呼ぶ場合がある）を細胞培養中に添加してもMHC-I分子を増加発現することのない細胞株を多数のヒト培養細胞株群からスクリーニングし、そのような細胞株中である特定の細胞株を用いた場合には、K562細胞株に比べて非常に高いNK細胞増殖効果を達成できることを見出した。本発明はこの知見に基づいて完成されたものである。

【0011】すなわち、本発明は、末梢血単核球細胞とヒトウイルス腫瘍細胞株HFWTとを混合培養する工程を含む、ヒトナチュラルキラー細胞の増殖方法を提供するものである。この発明の好ましい態様によれば、ヒト個体、好ましくは腫瘍患者より分離した末梢血単核球細胞を用いて、該個体自身のナチュラルキラー細胞を増殖させる上記方法；予め増殖能を失わせたヒトウイルス腫瘍細胞株HFWTを用いる上記方法；及びインターロイキン-2の存在下で培養を行う上記方法が提供される。

【0012】例えば、腫瘍患者の末梢血より分離した末梢血単核球細胞を本発明の方法に従ってヒトウイルス

腫瘍細胞株HFWTとともに培養することにより、患者本人のNK細胞を高い細胞傷害活性を保ったまま大量に増殖させることができる。また、これらの方法によって製造されたヒトナチュラルキラー細胞、及び腫瘍患者より分離した末梢血単核球細胞を用いて上記方法により増殖させた該腫瘍患者自身のナチュラルキラー細胞を含む、該腫瘍患者のための腫瘍治療剤が本発明により提供される。

【0013】別の観点からは、ヒトナチュラルキラー細胞の細胞傷害活性の測定方法であって、ヒトウイルス腫瘍細胞株HFWTとヒトナチュラルキラー細胞とを混合培養し、培養後に生存した標的細胞を染色する工程を含む方法が提供され、この方法の好ましい態様によれば、染色にクリスタルバイオレットを用いる上記方法が提供される。これらの方法によれば、放射性物質を使用せずに、ヒトNK細胞の細胞傷害活性を正確かつ簡便に測定できる。

【0014】

【発明の実施の形態】本発明の方法は、ヒトNK細胞を増殖させるにあたり、ヒトのウイルス腫瘍細胞株 HFWT を標的細胞としてヒトPBMCと混合培養することの特徴としている。本発明の方法によれば、PBMC中のNK細胞を選択的に増殖させることが可能である。ヒトのウイルス腫瘍細胞株 HFWTは理化学研究所（日本国埼玉県和光市広沢2番1号）の細胞開発銀行（日本国つくば市高野台三丁目1番1号）に細胞番号RCB0665として保存されており、申請により入手することが可能である。

【0015】本発明の方法において、培養方法は特に限定されないが、通常は、下記の方法に従って培養を行うことができる。通常の動物細胞培養用培地に血清又は血漿とリンパ球の増殖を支持する増殖因子とを添加し、ヒト末梢血より分離したPBMCを加え、この培養物をHFWT細胞に添加して培養する。培地に添加する血清又は血漿の種類は特に限定されず、市販の各種動物由来のものを用いることができるが、ヒト由来であって血液型がAB型のものが好ましく、PBMCを採取した本人由来のものがさらに好ましい。濃度は1ないし30容量%程度でよい。また、無血清状態でリンパ球の増殖を支持できる培地を用いることもできる。

【0016】増殖因子としてはインターロイキン-2（IL-2）が最も好ましいが、PBMCからリンパ球を増殖させるようなサイトカインの組み合わせや、リンパ球増殖を刺激するレクチン類、あるいはPBMCを採取した対象者とは異なるヒト個体から採取したPBMCで増殖能力を失わせる処理をほどこしたものを増殖因子の代わりに用いてもよい。増殖能を失わせる方法は特に限定されないが、放射線照射やマイトマイシンC処理など、当業者に知られている方法を用いることができる。添加するIL-2の濃度は10～2,000 国際単位/mlが好ましい。

【0017】PBMCとHFWT細胞との比は特に限定されないが、10:1程度とすることが好ましい。標的であるHFWT細



胞は付着性細胞であるため、一般的には、これらが付着している状態のまま、増殖能を失わせる処理を施して使用することが好ましい。もっとも、上記細胞を物理的に付着状態から引き剥がす等、浮遊状態にして用いることもできる。また、NK細胞が活性化して盛んに増殖している状態では、標的細胞であるHFWT細胞はNK細胞により速やかに殺されてしまうため、このような状態で標的細胞を用いるときは、その増殖能をあらかじめ失わせておく必要は必ずしもない。PBMCの培養期間は特に限定されないが、好ましくは5日間以上である。NK細胞は高い活性を維持した状態のまま増殖するが、自然にNK細胞が増殖能を失うまでの間は培養を継続可能である。

【0018】本発明により提供されるヒトナチュラルキラー細胞の細胞傷害活性の測定方法は、ヒトウイルス腫瘍細胞株HFWTとヒトナチュラルキラー細胞とを混合培養し、培養後に生存した標的細胞を染色することを特徴としている。この方法は、一般的には公知の方法 (Liu, S. Q., et al., Nature Medicine, 1, pp.267-271, 1995) に準じて、エフェクター細胞をNK細胞とし、標的細胞をHFWT細胞として行うことができる。染色にはクリスタルバイオレットを用いることが好ましい。HFWT細胞が付着性培養細胞であることから、本発明の方法によれば、放射性物質を使用することなく、正確かつ簡便にヒトNK細胞の活性を測定できる。

【0019】

【実施例】以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明の範囲は下記の実施例に限定されることはない。以下の実施例で用いた細胞株は、理化学研究所細胞開発銀行に保存されているヒト腫瘍細胞株209株をスクリーニングし、このうち慢性骨髄性白血病細胞株K562 (細胞番号RCB0027)、ウイルス腫瘍細胞株HFWT (細胞番号RCB0665)、メラノーマ細胞株HMV-II (細胞番号RCB0777) がMHC-I分子をほとんど発現していないこと (ただし後2者はK562細胞と同程度のわずかなMHC-Iの発現が確認されている)、これらの細胞では培養内で24時間IFNg添加処理をしてもMHC-I発現が増強されることは全くないことを、当業者に周知のフローサイトメトリー法で確認した上で用いた。

【0020】K562細胞には多数のバリエーションが存在することが知られており、原株 (Lozzio, C. B. and Lozzio, B. B., Blood, 45, pp.321-334, 1975) はIFNg処理によりMHC-Iの発現が誘導されるとされている。しかし、本実施例で用いているK562細胞株は原株から変異しており、IFNg処理によってもMHC-Iの発現が極めて低い状態のまま変化することはない。また、Higashino細胞は、病理診断でgliosarcomaとされた脳腫瘍組織から、理化学研究所細胞開発銀行において継代培養されたものであり、これは通常の培養下で常時強くMHC-I及びMHC-IIを発現している細胞である。この細胞は、MHC-Iをほとんど発現していない細胞株との比較対照として用いた。

【0021】例1：健常人のNK細胞の選択的培養

HFWT細胞を標的細胞にした場合、健常人のPBMCからNK細胞が選択的に増殖してくるか否かを検討した。

<方法>

#### 1. 標的細胞の培養

$1 \times 10^5$  個の標的細胞を24ウェルプレートの各ウェルに播種した。標的細胞としてはHigashino、HFWT、K562、HMV-IIを用い、培地としては、10%牛胎児血清添加Ham F12培地を用いた。これらの細胞を一夜培養した後、50 GyのX線を照射し、PBS(-)にて3回洗浄後、標的細胞として供した。

#### 2. PBMCの調製

健常者の末梢血30 mlからPBMCを当業者に周知の方法 (Kawai, K., et al., Cancer Immunol. Immunother. 35, pp.225-229, 1992) に従って分離した。なお、このときに採取される血漿はPBS(-)にて2倍に希釈されているが、それを以下の培養で使用した。使用濃度は2倍希釈状態で容量比で10% (すなわち、血漿としては5%) である。

#### 【0022】3. PBMCの培養

1ウェルあたり2 mlの血漿添加RHAM $\alpha$ 培地 (Kawai, K., et al., Cancer Immunol. Immunother. 35, pp.225-229, 1992) に懸濁した $1 \times 10^6$  個のPBMCを標的細胞上に播種した。また、培地中にIL-1 (終濃度167国際単位/ml、以下同様に終濃度を示す)、IL-2 (67国際単位/ml)、IL-4 (67国際単位/ml)、IL-6 (134国際単位/ml) を添加した。これを37℃の炭酸ガスインキュベーターで培養した。

#### 4. フローサイトメトリー

当業者に周知の方法で、培養された浮遊細胞群をそれぞれの細胞表面抗原に特異的に結合する単クローン抗体で蛍光染色し、FACS (ベクトンディッキンソン社製) で解析した。ここで使用した単クローン抗体のうち、抗CD3抗体はT細胞を識別するために使用、抗CD56抗体はNK細胞を識別するために使用した。

#### 【0023】5. 細胞数の計測

細胞数はタイ式血球計算盤を使用して計測した。

#### 6. 細胞傷害活性の測定

既報の方法 (Liu, S. Q., et al., Nature Medicine 1, pp.267-271, 1995) に従って、CV法により培養リンパ球の細胞傷害活性を測定した。本実施例では、生きている標的細胞にリンパ球を添加する直前の標的細胞の染色後の吸光度を100%とした。このため、24時間インキュベーション後では、対照となる標的細胞のみのウェル (エフェクター細胞と標的細胞の比 (以下、E/T比) が0のウェル) では標的細胞が増殖しているために細胞傷害活性が100%を越えているが、これは本実験において標的細胞自体は健全であったことを示している。

【0024】<結果>健常人1 (40才、女) のPBMCを用いて得た結果を表1の実験1及び実験2、並びに図1に

示し、健常者 2 (27才、男) から得た結果を表 1 の実験 3 及び図 2 に示す。

【0025】

【表 1】

標的細胞	表面抗原の異なる細胞の割合(%)	
	CD3+ CD56-	CD3- DD56+
実験 1 (13日間培養)		
なし	58.2	5.4
Higashino	96.0	0.2
HFWT	19.8	54.6
K562	47.8	17.6
実験 2 (14日間培養)		
なし	60.9	13.0
Higashino	84.8	5.4
HFWT	7.3	75.9
HMV-II	55.0	18.9
実験 3 (13日間培養)		
なし	74.4	7.2
Higashino	95.1	1.7
HFWT	12.4	64.6

【0026】本実施例で用いた 4 種の IL の組み合わせは、MHC-I 分子と抗原ペプチドを同時に認識して殺す性質のある CTL を誘導培養するために適するものである (Liu, S. Q., et al., Cancer Immunol Immunotherapy, 39, pp. 279-285, 1994)。健常人の PBMC は通常 8~25% の NK 細胞を含むが、表 1 に示したように、CD3+CD56- で表される T 細胞は Higashino 細胞を標的細胞とした場合には 96% に達するものの、CD3-CD56+ で表される NK 細胞は、健常者 1 の PBMC を用いた実験 1 ではほとんどなくなり、実験 2 でも 5.4% となっている。一方、MHC-I 分子がほとんど表面にない HFWT 細胞を標的細胞とした場合は、逆に T 細胞の割合が大幅に低下し、NK 細胞の割合が 54.6% にまで上昇した。この割合は、同じように MHC-I 分子がほとんど表面にない K562 細胞を標的細胞とした場合の結果 (17.6%) に比べても明らかに高い。実験 2 でもこれらの傾向は変わらず、NK 細胞の割合は HFWT 細胞を標的細胞とした場合には 75.9% に達し、同じように MHC-I 分子がほとんど表面にない HMV-II 細胞を標的細胞とした場合 (18.9%) に比べても明らかに高い。

【0027】健常者 2 の末梢血から PBMC を調製した直後では、CD3+CD56- の T 細胞は 55.4%、CD3-CD56+ の NK 細胞は 13.2% であった。表 1 の実験 3 に示したように、培養 3 日後には、Higashino 細胞を標的にした場合は 95.1% が T 細胞で占められ、NK 細胞はほとんどなくなり、逆に HFWT 細胞を標的にした場合は NK 細胞が 64.6% にまで増加した。しかも、図 1 に示すように、健常者 1 の PBMC 由来の細胞増殖は、Higashino 細胞と HFWT 細胞を標的とした方が、HMV-II 細胞を標的にした場合や標的細胞がない場合に比べて明らかに高い。健常者 2 の場合 (図 2) は、Higashino 細胞を標的とした場合よりも HFWT 細胞を標的とした場合の方がさらに効率よく PBMC 由来細胞が増殖し

た。

【0028】さらに、実験 3 で得た培養リンパ球群を用いて、細胞傷害試験を行った結果を図 3 に示す。Higashino 細胞を標的として得た培養リンパ球群は、4 種の IL を組み合わせて培養したため CTL となっていることが予想されたが、実際、このリンパ球群は細胞傷害活性測定時に標的細胞とした生きている Higashino 細胞を非常によく殺した。E/T 比が 0 のとき (すなわち標的細胞のみのとき)、24 時間で標的細胞が 147% と増殖する条件下でも、E/T 比が 2 のときの生残標的細胞は 47.6% となった。E/T 比が 8 のときの生残標的細胞はわずか 7.5% となった。このときの生残標的細胞の割合は、E/T 比が低ければ高くなり、明瞭な用量依存関係が認められた。しかし、細胞傷害活性測定時の標的細胞が生 HFWT 細胞である場合には、Higashino 細胞を標的として得たリンパ球群は HFWT 細胞を全く殺さず、ここで得た培養リンパ球群が典型的 CTL であることが確認された。

【0029】一方、HFWT 細胞を標的として得た培養リンパ球群は、生 HFWT 細胞を非常によく殺した。E/T 比が 2 のときの生残標的細胞は 18.5% となった。E/T 比が 8 のときの生残標的細胞は 9.2% まで低下した (マイナス値となったのは測定誤差のためである)。このときの生残細胞の割合は、E/T 比が低ければ高くなり、用量依存関係が認められた。従って、細胞傷害活性測定時に生きている HFWT 細胞を標的細胞とすることにより、NK 細胞の細胞傷害活性を正確に測定できる。

【0030】また、この培養リンパ球群には 12.4% の T 細胞が含まれており、生 HFWT 細胞に比べれば程度は明らかに低くなるものの、生 Higashino 細胞も殺していることから、この中には NK 細胞だけではなく若干の CTL も含まれていると推定される。E/T 比が 2 のときの生残標的

細胞は60.5%、E/T比が8のときの生残標的細胞は21.8%となった。従って、これら実験から明らかなように、HFWT細胞を標的とすれば、高い細胞傷害活性を保ったNK細胞をPBMCから選択的に、かつ効率よく増殖させることができる。

【0031】例2：NK細胞の選択的培養に必要なインターロイキン

例1では増殖能を失わせたHFWT細胞を標的細胞として、健常者のPBMCからNK細胞が選択的に増殖培養できることを示したが、培養に4種類のILを用いていた。この例では、リンパ球にとって最低限必要といわれるIL-2のみを添加した培地を用いて、HFWT細胞を標的細胞としてNK細胞の選択的培養を行った。方法は培地に添加するILの種類を変更したこと以外は全て例1と同じである。ただし、IL-2のみを添加する場合の濃度は500国際単位/mlとした。また、フローサイトメトリー法で培養された細胞群を調べる際、NK細胞を識別するために、抗CD56抗体の他に抗CD16抗体も使用した。

【0032】図4に示すように健常者1、健常者2、健常者3（56才、男）由来のすべてのPBMCとも、HFWT細胞を標的細胞として培養した場合に、4種のIL添加でもIL-2のみの添加でも、ほぼ同じように増殖した。図4(C)に示すように、健常者3由来PBMCでは、標的細胞を使用せず、しかもIL-2のみを添加した培養では細胞増殖は大きく遅れた。

【0033】健常者1のPBMCでは、当初8.0%しかなかったCD3-CD56+で表されるNK細胞の割合は、培養14日後に標的細胞を追加して再刺激したところ、ILとしてIL-2のみを添加した培養でも、培養17日後には77.3%に達した。このような再刺激をしていない健常者2のPBMCの場合では、培養13日後には、IL-2のみを添加した培養でも、CD3-CD56+で表されるNK細胞の割合は90.7%、またCD16+で表されるNK細胞の割合は79.1%、CD16+CD56+で表されるNK細胞の割合は78.2%となった。健常者3でもこの

ような傾向は変わらず、培養13日後には、IL-2のみを添加した培養でも、CD3-CD56+で表されるNK細胞の割合は74.9%、またCD16+で表されるNK細胞の割合は76.5%、CD16+CD56+で表されるNK細胞の割合は75.7%となった。

【0034】これら健常者2および3から得たほとんどNK細胞となったリンパ球群の細胞傷害活性を見た結果を図5に示す。このときの生標的細胞はHFWTである。健常者2の場合も健常者3の場合も、十分に活性が強いNK細胞が得られており、HFWT細胞を標的としてPBMCからNK細胞を選択的に培養する際に添加するILはIL-2のみでよく、高い細胞傷害活性を保ったまま、選択的に効率よく増殖させることができる。

【0035】例3：腫瘍患者PBMCからの選択的なNK細胞の増殖培養

例1及び例2では健常者のPBMCを用いたが、この例では腫瘍患者のPBMCを用いてNK細胞の選択的増殖培養が可能であるか否かを検討した。試験は例1に従って行い、ただし、PBMC培養時の標的細胞としてはHFWT細胞又はK562細胞を用い、ILとしてはIL-2のみを添加し、濃度は500国際単位/mlとした。また、フローサイトメトリー法で培養された細胞群を調べる際、NK細胞を識別するために抗CD56抗体の他に抗CD16抗体も追加して使用した。患者（51才、男）はgliosarcomaと診断された脳腫瘍患者で、例1及び例2で使用しているHigashino細胞を採取した本人である。

【0036】図6に結果を示す。PBMC由来のリンパ球の増殖は、標的細胞としてはK562細胞よりもHFWT細胞の方がよかった。1×10<sup>4</sup>個から出発して、累積増殖リンパ球数の最高値が、K562細胞を標的とした場合では3.05×10<sup>7</sup>個であるのに対し、HFWT細胞を標的とした場合では15.6×10<sup>7</sup>個に達した。また、PBMC由来細胞群の構成を表2に示した。

【0037】

【表2】

標的細胞	表面抗原の異なる細胞の割合(%)		
	CD3+CD56-	CD3-CD56+	CD16+CD56+
(13日培養)			
HFWT	0.4	83.8	54.7
K562	1.9	81.5	51.7

【0038】K562細胞を標的として増殖培養した場合、及びHFWT細胞を標的として増殖培養した場合のいずれでも、CD3-CD56+で表されるNK細胞の割合は82%前後、CD16+CD56+で表されるNK細胞の割合は53%前後とほとんど同じであった。得られたリンパ球群の細胞傷害活性は、生HFWT細胞を標的として測定した結果、K562細胞とHFWT細胞のどちらを標的細胞として増殖培養したリンパ球群でも、非常に強力であった（図7）。

【0039】

【発明の効果】本発明により、従来の方法よりも一層効

率的なヒトNK細胞の増殖培養が可能になり、大量のNK細胞が容易に得られる。腫瘍患者PBMCを材料として本発明により得られたNK細胞は、その患者本人の体内に拒絶反応等の問題なく戻すことができるため、腫瘍治療や感染症治療に適用できる。

【図面の簡単な説明】

【図1】 本発明の方法により、健常者1（40才、女）のPBMCを用いてNK細胞の選択的培養を行った結果を示した図である。

【図2】 本発明の方法により、健常者2（27才、男）



のPBMCを用いてNK細胞の選択的培養を行った結果を示した図である。

【図3】 例1の実験3で得た培養リンパ球群を用いて、細胞傷害試験を行った結果を示した図である。

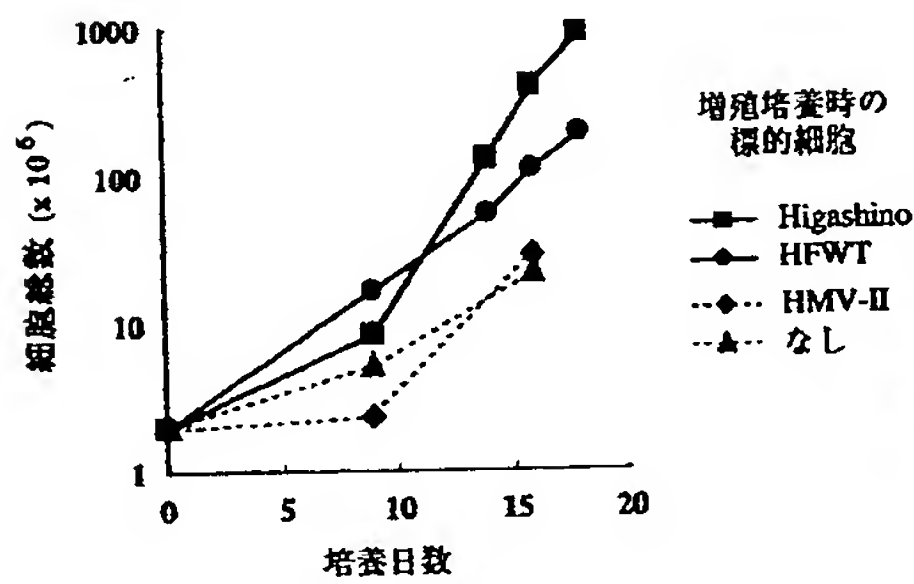
【図4】 NK細胞の選択的培養におけるインターロイキン添加の効果を示した図である。図中、ILsは培養に4種類のインターロイキンを用いた場合の結果を示し、IL-2はインターロイキン-2のみを添加した場合の結果を示す。

【図5】 NK細胞の選択的培養におけるインターロイキン添加の効果として、健常者2及び3から得たNK細胞を含むリンパ球群の細胞傷害活性を示した図である。

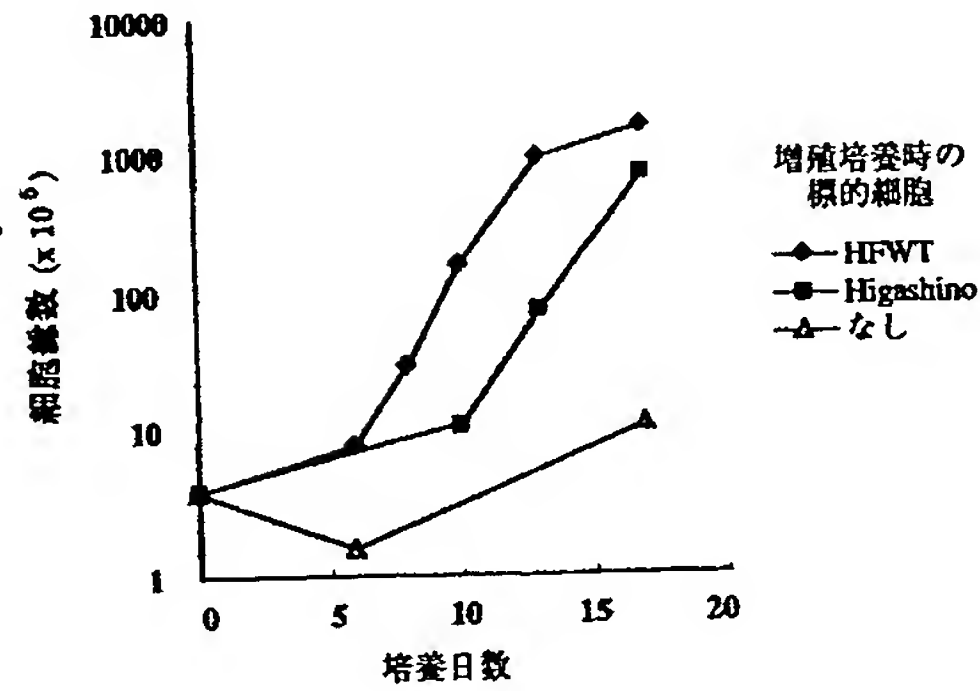
【図6】 腫瘍患者のPBMCを用いて本発明の方法により選択的にNK細胞を増殖培養した結果を示した図である。

【図7】 腫瘍患者のPBMCを用い、K562細胞又はHFWT細胞を標的として増殖培養した場合について細胞傷害試験を行った結果を示した図である。

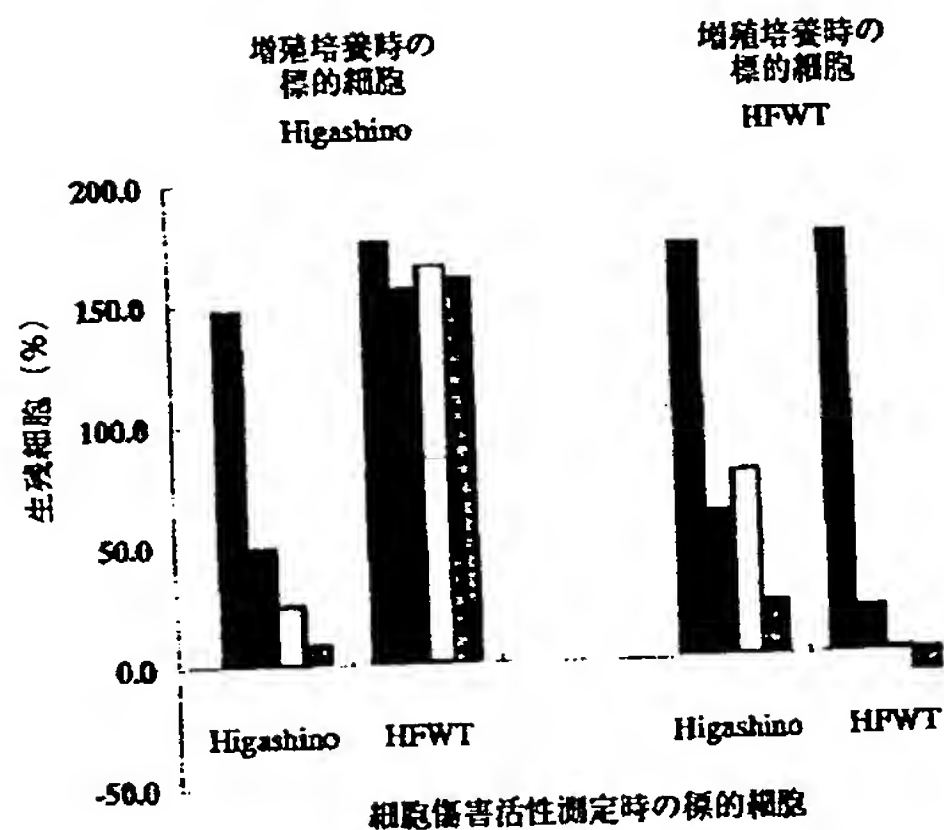
【図1】



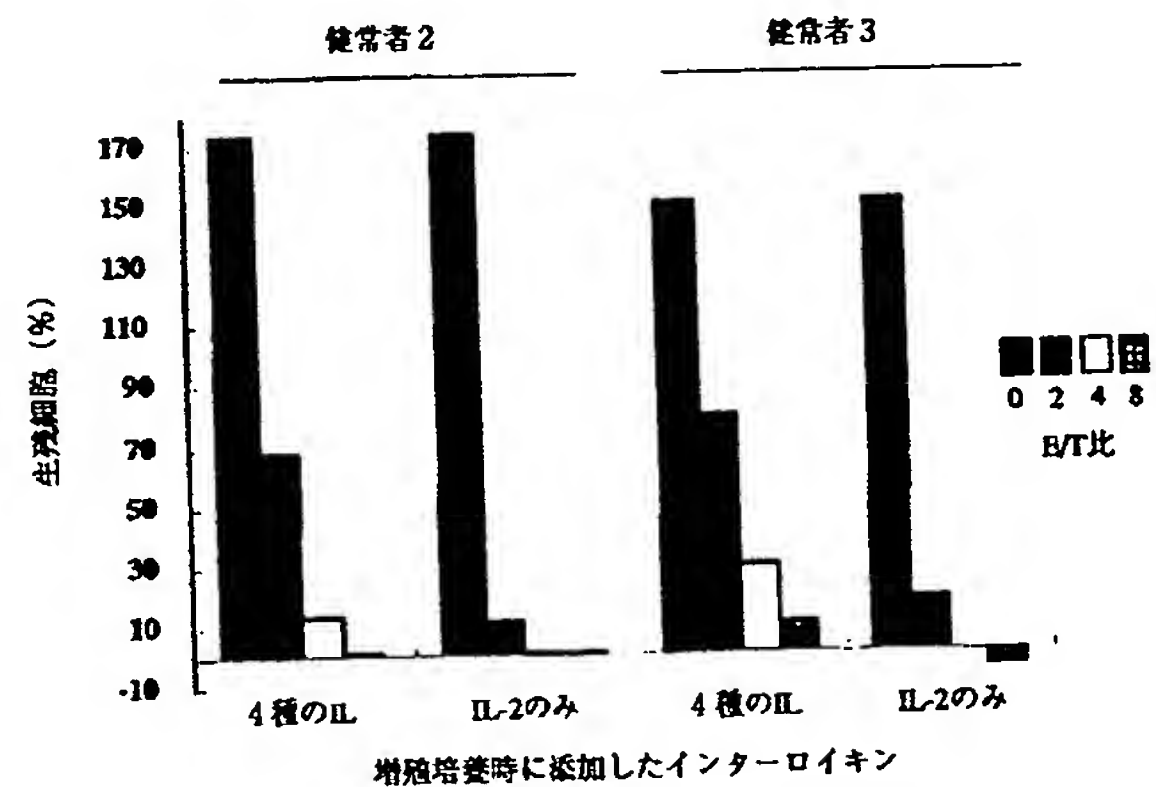
【図2】



【図3】

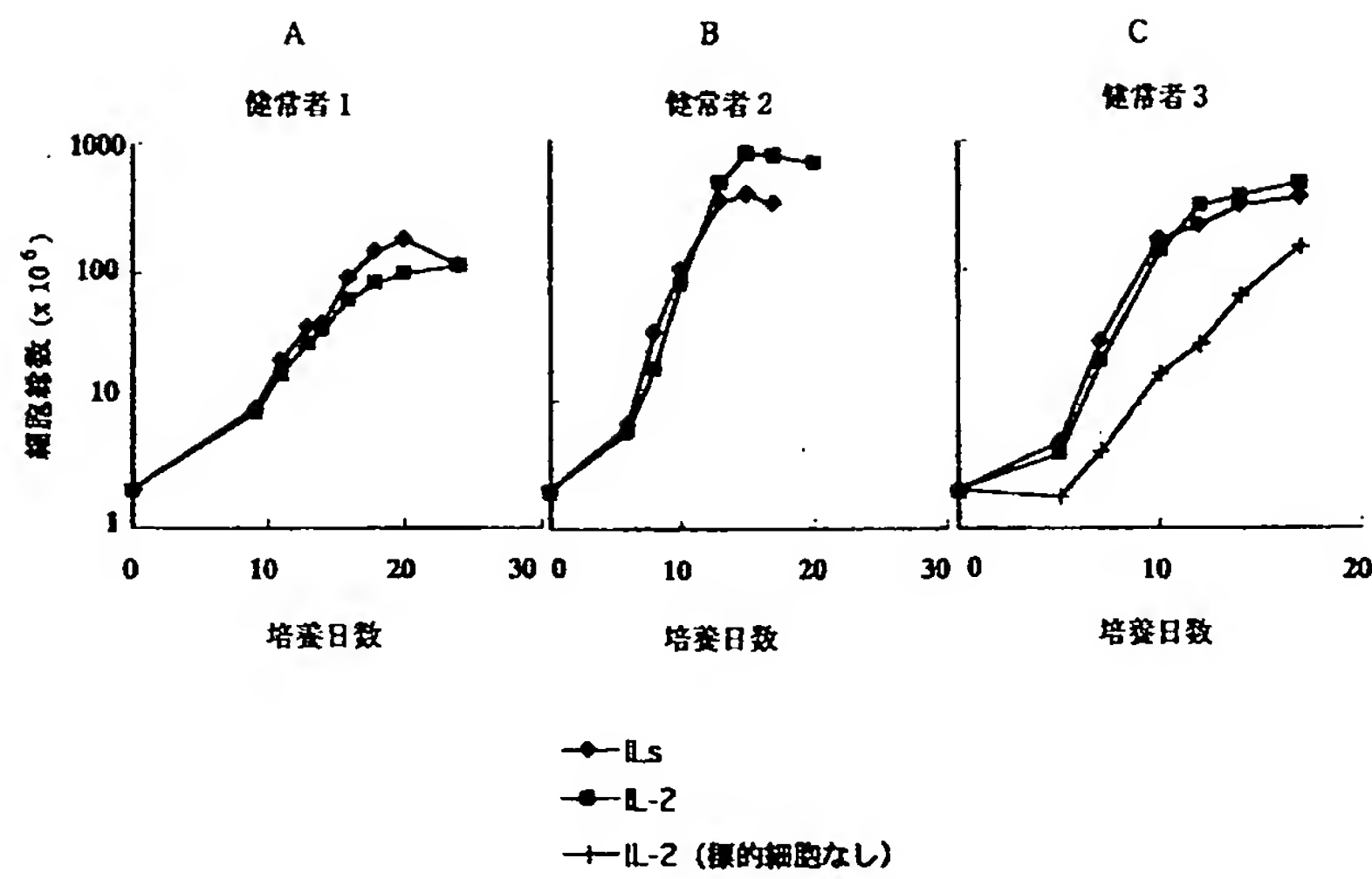


【図5】

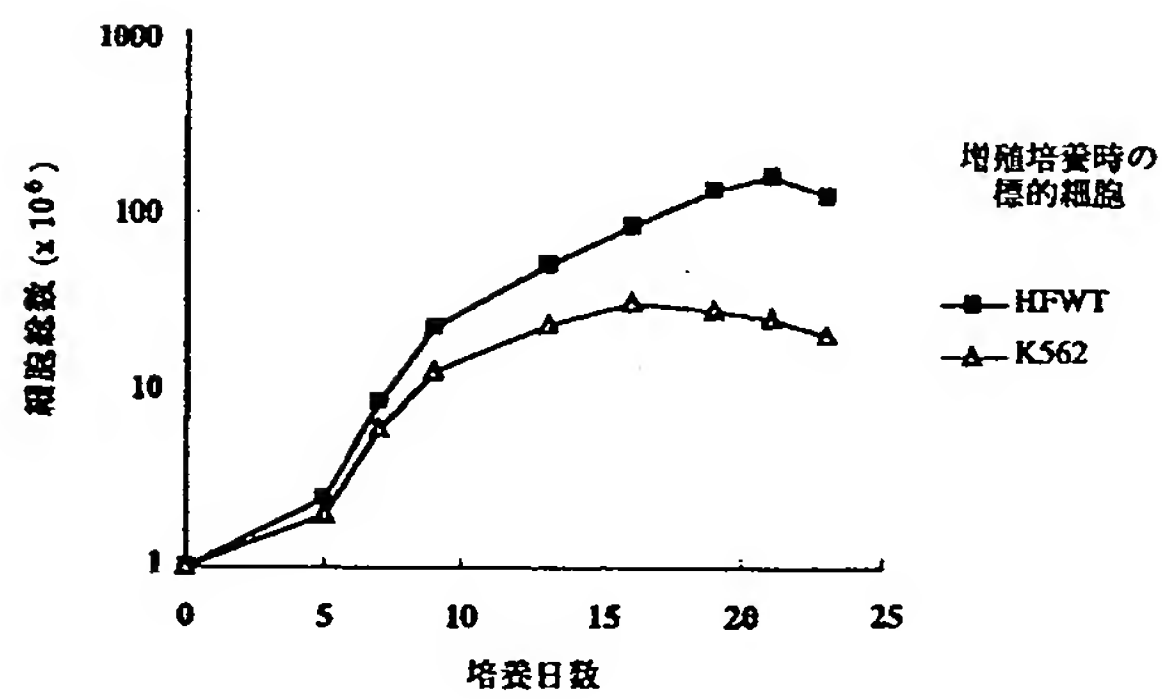




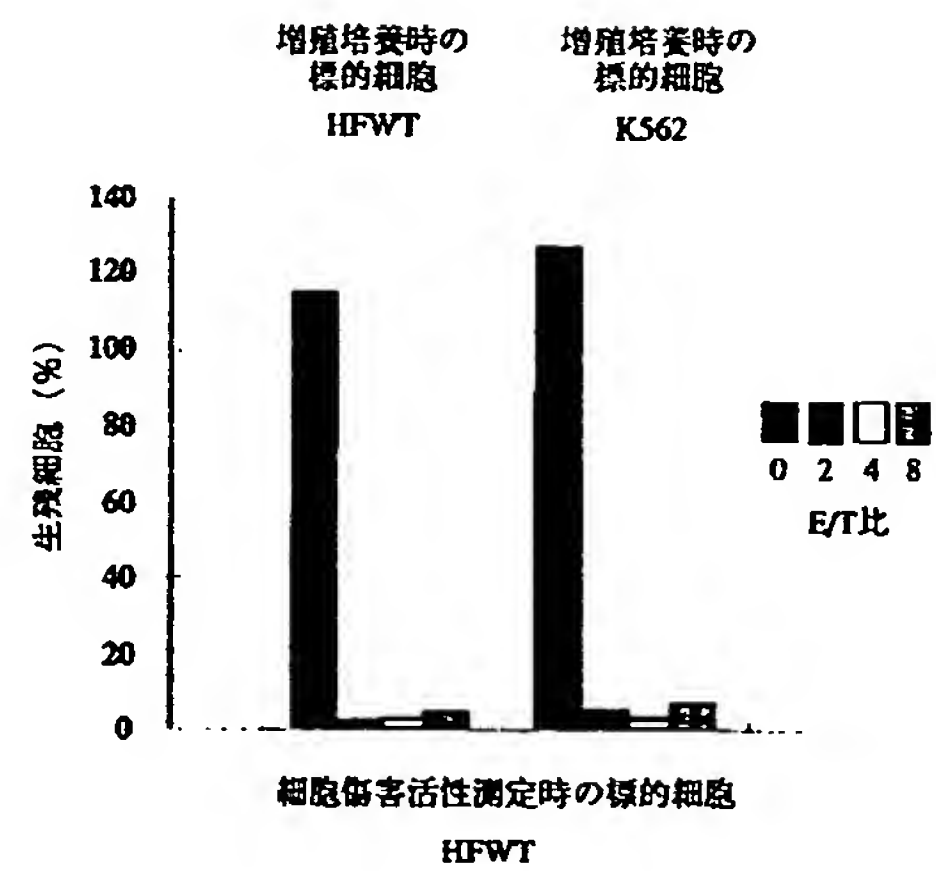
【図4】



【図6】



【図7】



フロントページの続き

Fターム(参考) 4B063 QA01 QA07 QQ02 QQ08 QR69  
 QR72 QR77 QS22 QS36 QX01  
 4B065 AA93X AA94X BA24 BA30  
 BB23 BB34 BC50 CA44  
 4C087 AA01 AA02 BB37 DA31 NA14  
 ZB26

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**